

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Juli 2004 (08.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/057334 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/543, C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE2003/004127**

(22) Internationales Anmeldedatum:
15. Dezember 2003 (15.12.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
102 59 820.7 19. Dezember 2002 (19.12.2002) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE). INFINEON TECHNOLOGIES AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; St.-Martin-Str. 53, 81669 München (DE).**

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **SCHIENLE, Meinrad [DE/DE]; Unterbiberger Str. 15, 85579 Neubiberg (DE). THEWES, Roland [DE/DE]; Jägerheimstr. 7, 82194 Gröbenzell (DE). GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte 1, 91074 Herzogenaurach (DE). MUND, Konrad [DE/DE]; Langenbrucker Weg 10, 91080 Uttenreuth (DE).**

(74) Gemeinsamer Vertreter: **SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München (DE).**

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): **CA, JP, US.**

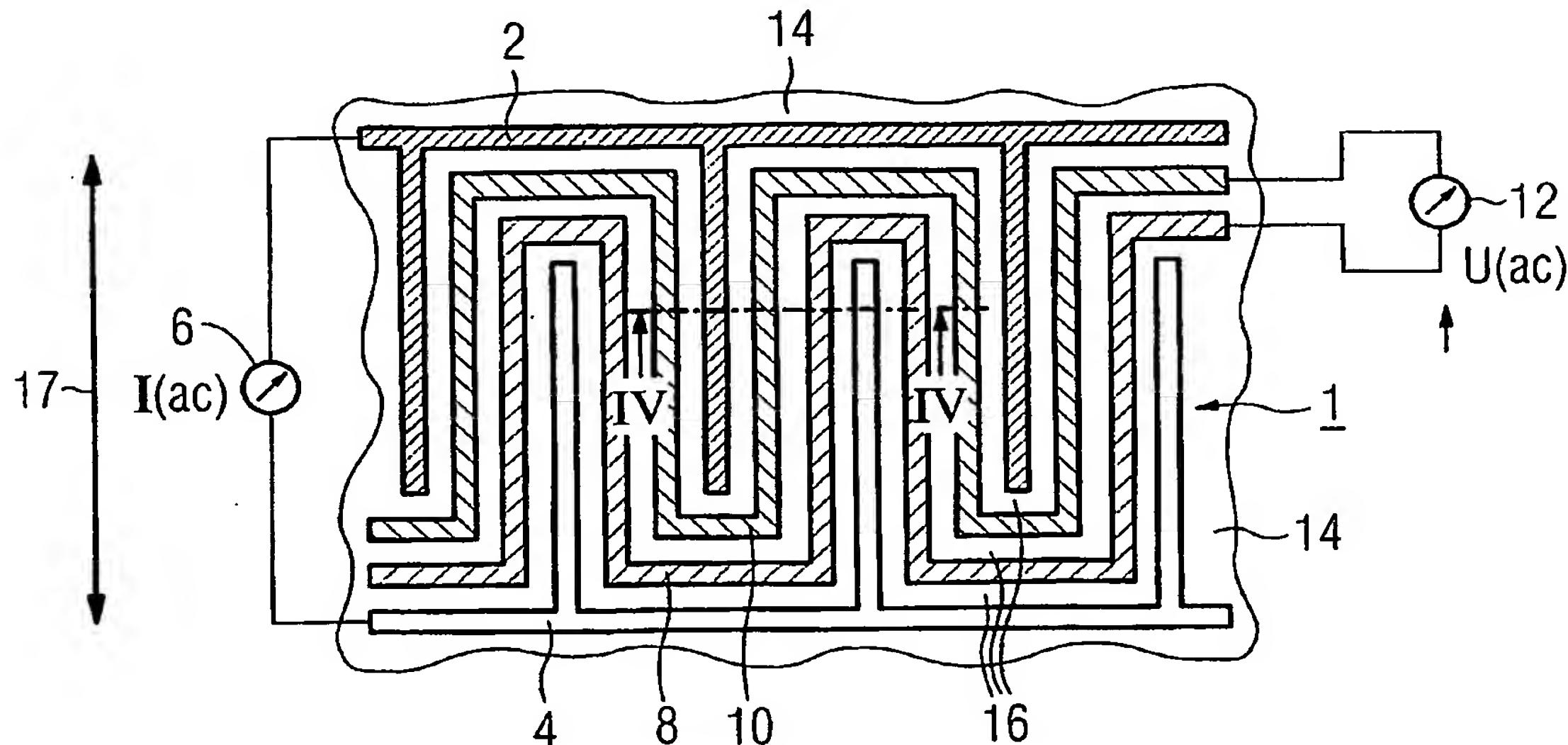
(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): **europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).**

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **DNA CHIP COMPRISING A MICROARRAY MADE OF AN MICROELECTRODE SYSTEM**

(54) Bezeichnung: **DNA-CHIP MIT EINEM MIKROARRAY AUS MIKROELEKTRODENSYSTEM**



(57) **Abstract:** The invention relates to a DNA chip comprising a carrier (14) and a microarray of spots (1) containing immobilised catcher molecules which are arranged on said carrier. Each spot (1) contains a microelectrode system for the impedance spectroscopic detection of binding events occurring between the catcher molecules and target molecules of an analyte solution (38) applied to the spots (1). The microelectrode system has a pair of polarisation electrodes (2,4) in order to produce an alternating electromagnetic field and a pair of sensor electrodes (8,10) for measuring a voltage drop in the analyte (38).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2004/057334 A1



- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: DNA-Chip mit einem Träger (14) und einem darauf angeordneten Mikroarray von immobilisierte Fängermoleküle enthaltenden Spots (1), wobei jeder Spot (1) ein Mikroelektrodensystem zur impedanzspektroskopischen Detektion von Bindungsereignissen zwischen den Fängermolekülen und Zielmolekülen einer auf die Spots (1) applizierten Analytlösung (38) enthält. Das Mikroelektrodensystem muss dabei ein Paar Polarisationselektroden (2,4) zur Erzeugung eines elektromagnetischen Wechselfeldes und ein Paar Sensorelektroden (8,10) zur Messung eines Spannungsabfalls im Analyten (38) umfassen.

7/PR/5. JC05 Rec'd PCT/PTO 20 JUN 2005

Beschreibung

DNA-Chip mit einem Mikroarray aus Mikroelektrodensystemen

5 Die Erfindung betrifft einen DNA-Chip mit einem Mikroarray aus Mikroelektrodensystemen entsprechend dem Oberbegriff des Patentanspruches 1.

Ein DNA-Chip umfasst allgemein einen meist flach ausgebildeten Träger, auf dem ein Mikroarray aus Spots angeordnet ist. 10 Ein Spot enthält auf den Oberflächen von Träger und Elektroden immobilisierte Fängermoleküle, beispielsweise Oligonucleotide. Zur Durchführung einer Analyse wird auf die Spots eine Zielmoleküle, beispielsweise DNA-Bruchstücke, enthaltende 15 Analytlösung aufgebracht. Im Falle einer komplementären Übereinstimmung in der Basensequenz koppeln die Zielmoleküle an die Fängermoleküle eines Spots an. Die Auslesung des Analysergebnisses, also die Bestimmung jener Spots, in denen Kopplungs- bzw. Bindungsereignisse stattgefunden haben, kann 20 beispielsweise optisch, kalorimetrisch oder elektrisch erfolgen.

Aus der DE 196 10 115 C2 und der Veröffentlichung „Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors“, Van 25 Gerwen et al., Sensors and Actuators, B49, 1998, 73-80, Elsevier Science S.A. sind elektrisch auslesbare DNA-Chips bekannt, die zur elektrischen Detektion von Bindungsereignissen zweipolige Mikroelektrodensysteme aufweisen. Diese sind jeweils aus einem Paar kammartiger, miteinander verzahnter 30 Elektroden gebildet, welche mit Wechselstrom beaufschlagt sind. Im Bereich der Elektroden stattfindende Bindungsereignisse verändern elektrische Parameter wie z.B. den Leitwert und die spezifische Kapazität des Analyten und sind dementsprechend mit Hilfe des Mikroelektrodensystems detektierbar.

35

Problematisch bei derartigen DNA-Chips ist, dass die Dimension der Elektroden sehr groß ist im Vergleich zu den molekula-

ren Dimensionen der in monomolekularer Lage auf der Träger- und Elektrodenoberfläche vorhandenen Fänger moleküle. Dort stattfindende Bindungssereignisse sind daher nur schwer detektierbar. Bei van Gerwen et al wird zur Verbesserung des Mess- 5 effektes bzw. der Sensitivität eine Verkleinerung der Elektroden vorgeschlagen. Einer Miniaturisierung sind jedoch aus technischen und ökonomischen Gründen Grenzen gesetzt.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass beim Nachweis von 10 biochemischen Molekülen relativ hohe Elektrolytleitwerte und dementsprechend niedrige Analytwiderstände vorliegen. Diese werden von der meist sehr hohen, durch die Elektrolyt-Doppel- schichtkapazität zwischen Elektroden und Analyt hervorgerufe- ne, Elektrodenimpedanz überlagert. Eine Separierung von Ana- 15 lytwiderstand und Elektrodenimpedanz ist nahezu unmöglich. Außerdem sind aufgrund des kleinen Analytwiderstandes sehr hohe Messfrequenzen nötig. Dies ist mit herkömmlicher Mess- technik jedoch sehr schwierig, da parasitäre Kapazitäten, wie Kabelkapazitäten etc., die Messung stören.

Bei herkömmlichen DNA-Chips sind also die Messeffekte zur Ermittlung der Kapazität bzw. des Widerstands des Analyten sehr schwach ausgeprägt oder nicht vorhanden. Darüber hinaus müssen die Messfrequenzen im MHz-Bereich liegen. Außerdem beein- 25 flussen alle chemischen oder physikalischen Vorgänge, die an den Elektroden stattfinden, die Messung zwischen den Elektroden, so z.B. Belegungen mit biochemischen Molekülen, Polari- sierungen, Korrosion der Elektroden, Filmbildung usw.

Weiterhin ist aus DE 100 15 816 A1 ein elektrisch auslesbarer 30 DNA-Chip bekannt, bei dem ein Zweipol-Elektrodensystem zum elektrischen Monitoring eines Redox-Cycling-Prozesses ermög- licht wird. Gegebenenfalls kann dazu weiterhin eine dritte Elektrode mit Potentialbeaufschlagung zur Steuerung des Re- 35 dox-Cycling-Prozesses vorhanden sein.

Ausgehend vom Stand der Technik ist es Aufgabe der Erfindung, einen verbesserten elektrisch auslesbaren DNA-Chip zu schaffen, mit dem die Erfassung von analytischen Messwerten erleichtert ist.

5

Diese Aufgabe wird durch die Gesamtheit der Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

10 Bei der Erfindung ist das Mikroelektrodensystem als Dünneschicht-Vierpolsystem aufgebaut. Dabei umfasst der DNA-Chip ein Paar Polarisationselektroden zur Erzeugung eines elektromagnetischen Wechselfeldes und ein Paar Sensorelektroden zur Messung eines bindungsinduzierten Spannungsabfalls im Analyten. Die Polarisationselektroden sind dabei mit Wechselstrom bzw. -spannung gegebener Amplitude und gegebener Frequenz beaufschlagt. Mit Hilfe der Sensorelektroden und eines an sie angeschlossenen hochohmigen Messverstärkers lässt sich eine durch Bindungereignisse hervorgerufene Widerstandänderung 15 als Spannungsänderung polarisierungsfrei abgreifen. Der störende Einfluss der Elektrodenimpedanz ist somit eliminiert. Der Spannungsabgriff an den Sensorelektroden erfolgt hochohmig, so dass keine nennenswerten Ströme aus den Sensorelektroden aus- oder in diese eintreten. Auch findet hierdurch an 20 den Sensorelektroden keine zusätzliche Polarisation statt, was die oben beschriebenen nachteiligen Effekte wie Polarisation, Filmbildung, Oxidation etc. minimiert. Diese Effekte können zwar nach wie vor an den Polarisationselektroden auftreten, gehen jedoch wegen der Spannungsmessung rein über die 25 Sensorelektroden nicht oder nur wesentlich geringer in die Messergebnisse ein.

Durch die Trennung von polarisierenden Polarisationselektroden und messenden Sensorelektroden, an denen praktisch keine 30 störenden chemischen oder physikalischen Vorgänge stattfinden, wird vorteilhafterweise die Qualität der Messung erheblich gesteigert. Dabei ist der Aufbau des Vierpolsystems mit

Dünnschichtelektroden wesentlich, wobei solche Dünnschichtelektroden vorteilhafterweise durch die in der Halbleitertechnologie bekannten Verfahren in den Chip integriert werden können.

5

Bei einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung weist der Träger des DNA-Chips ein Siliziumsubstrat auf, auf dem das Mikroelektrodensystem vorzugsweise in Dünnschichttechnik integriert ist. Dabei sind die Elektroden direkt an eine sich im 10 Si-Substrat befindliche integrierte Schaltung angeschlossen. Vorteilhaft dabei ist insbesondere das Fehlen von Zuleitungskapazitäten, welche sich vor allem bei Messungen im höheren Frequenzbereich, z.B. ab 10 MHz störend bemerkbar machen würden. Ein DNA-Chip der genannten Ausgestaltung ist somit auch 15 bei hohen Messfrequenzen anwendbar.

Trotz der beschriebenen Maßnahmen sind noch weitere Parasitärkapazitäten zwischen den an der Messung beteiligten Elektroden vorhanden, die in ungünstigen Fällen störend bei der 20 Impedanzmessung im Analyten sein können. Um hier Abhilfe zu schaffen, ist bei einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung einer Sensorelektrode eine Schirmelektrode zugeordnet, die auf dem gleichen elektrischen Potential wie die Sensorelektrode gehalten ist. Vorzugsweise wird das elektrische Potential der Sensorelektrode an der Schirmelektrode 25 durch einen an der Sensorelektrode angeschlossenen Pufferverstärker mit Verstärkung 1 gehalten. Der Pufferverstärker als aktives elektronisches Element entkoppelt Potential und Stromstärke, bzw. Ladung. Die zwischen den zusätzlichen 30 Schirmelektroden und den anderen Elektroden auftretenden Parasitärkapazitäten sind so für die Messung elektrisch nicht wirksam, da das Laden oder Entladen der Kapazitäten vom aktiven Verstärker übernommen wird und so das Messgerät und die 35 Sensorelektroden zur Potentialmessung entlastet sind. Schirmelektroden können z.B. beidseits der Sensorelektroden ausgeführt sein oder nur zwischen Sensorelektroden und Polarisationselektroden liegen. Die Effekte der Abschirmung durch die

Schirmelektroden und die anwachsende Distanz einer Elektrodeneinheit durch Einfügen von Schirmelektroden sind im Einzelfall gegeneinander abzuwägen.

5 Der Pufferverstärker ist auf dem DNA-Chip integriert. Hierdurch ergibt sich ein besonders kompakter und wirkungsvoller Aufbau des DNA-Chips. Die Zuleitungen werden so kurz wie möglich gehalten und damit Störungen in sämtlichen Signalleitungen so gut wie möglich ausgeschlossen.

10

Um einen die Messung verfälschenden Stromfluss innerhalb der Sensorelektroden und auch der Schirmelektroden zu vermeiden, sollten diese Elektroden deutlich kleiner sein als die Potentialelektroden. Bei einer Breite der Potentialelektroden von 15 1 μm würde dies für die genannten Elektroden eine technisch nicht mehr realisierbare weitere Verkleinerung bedeuten. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird daher ein anderer Weg beschritten. Hier sind Sensor- und/oder Schirmelektroden gänzlich galvanisch vom Analyten getrennt und damit ein 20 Stromfluss zwischen Analyt und Elektroden verhindert.

Bei einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel wird dies durch eine punktförmige Ausgestaltung der Sensorelektroden erreicht. Dabei ist es erforderlich, dass eine Einrichtung 25 zum Abgriff des Spannungsabfalls an den Sensorelektroden einen hohen Eingangswiderstand und eine niedrige Eingangskapazität aufweist. Die elektrische Verbindung der punktförmigen Sensorelektroden wird vorzugsweise durch eine im Substrat eingebettete („vergrabene“) Sammelleitung bewerkstellt, die 30 über Durchkontaktierungen mit den Sensorelektroden elektrisch verbunden ist.

Um die Tauglichkeit eines DNA-Chips als biochemisches Analyse-35 system zu gewährleisten, müssen die Elektrodengeometrien und damit der impedanzspektroskopische Erfassungsbereich möglichst an die Dimensionen biochemischer Moleküle angenähert werden. Eine Elektrodenbreiten von etwa 500 nm unterschrei-

tende Miniaturisierung ist jedoch nur mit aufwendigster Technik zu sehr hohen Kosten realisierbar. Dabei kommt bei einem 4-Elektrodensystem erschwerend hinzu, dass der Abstand der Polarisationselektroden zueinander von Haus aus größer ist 5 als bei einem 2-Elektrodensystem, weil ja zwischen den Polarisationselektroden weitere, z.B. die Sensorelektroden liegen. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsvariante ist nun eine das Mikroelektrodensystem einbettende Reaktionsschicht vorgesehen, welche den Raum, in dem Bindungseignisse stattfinden und impedanzspektroskopisch erfasst werden 10 können, wesentlich vergrößert. Mit der Reaktionsschicht lässt sich somit die Anzahl von erfassbaren Bindungseignissen und damit der Messeffekt bzw. die Sensitivität eines DNA-Chips erheblich steigern.

15

Die Reaktionsschicht hat vorzugsweise eine Dicke, die mit der Breite der Elektroden korreliert ist, und entspricht vorteilhafterweise etwa dem 5-10fachen der Elektrodenbreite. In jedem Fall sollte die Reaktionsschicht eine Dicke unter 100 μm , 20 da sich sonst zu lange Diffusionswege und damit verbunden zu lange Reaktionszeiten für den Transport der Zielmoleküle zu den Fängermolekülen ergeben würden. Geht man von 1 μm (1000 nm) als Elektrodenbreite aus, liegt die Dicke der Reaktionsschicht etwa 5 bis 10 μm . Damit ist gewährleistet, dass 25 die in einer auf die Reaktionsschicht aufgebrachten Analytlösung enthaltenen Zielmoleküle mit ausreichender Geschwindigkeit eindiffundieren können. Als besonders geeignet haben sich Hydrogele zum Aufbau einer Reaktionsschicht herausgestellt.

30

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen

35

Fig. 1 die Draufsicht auf einen DNA-Chip mit Elektrodenmikrosystem in Interdigitalstruktur,

Fig. 2 die Draufsicht auf ein Elektrodenmikrosystem mit vergrabenen Sammelleitungen,

Fig. 3 die Draufsicht auf ein Elektrodenmikrosystem mit punktförmigen Sensorelektroden,

5 Fig. 4 den Schnitt durch das Elektrodenmikrosystem aus Fig. 1 entlang der Linie IV-IV ohne (a) und mit (b) einer Reaktionsschicht,

10 Fig. 5 den Schnitt durch das Elektrodenmikrosystem aus Fig. 1 entlang der Linie IV-IV mit auf Stegen liegenden und teilweise (a) bzw. ganz (b) vergrabenen Elektroden,

15 Fig. 6 Elektrodenanordnungen in Draufsicht in Interdigitalstruktur (a) bzw. mit vergrabenen Elektrodensammelleitungen und Durchkontaktierungen (b),

20 Fig. 7 Elektrodenanordnungen im Querschnitt mit Schirmelektroden und verschieden isolierten bzw. vergrabenen Elektroden (a) bis (e),

Fig. 8 Elektrodenanordnungen im Querschnitt mit übereinander liegenden Polarisations- und Sensorelektroden in verschiedenen Ausführungsformen (a) bis (f),

25 Fig. 9 Elektrodenanordnungen im Querschnitt mit Beispielen von Kombinationen der unterschiedlichen Anordnungs-techniken (a) bis (d), jeweils in Prinzipdarstellung.

30 Fig. 1 zeigt einen Ausschnitt eines DNA-Chips in Draufsicht, wobei ein Träger 14 angedeutet ist. Der Ausschnitt zeigt einen Spot 1. Dessen Mikroelektrodensystem zeigt ein Paar Polarisationselektroden 2 und 4. Die Polarisationselektroden 2 und 4 sind von einer Stromquelle 6 gespeist. Die Stromquelle 6 erzeugt einen durch die Elektroden 2 und 4 fließenden Wechselstrom, der einen sich über der Elektrodenanordnung befindenden, nicht im Einzelnen dargestellten Analyten polarisiert. Der Analyt schließt also den Stromkreis über Stromquelle 6 und Polarisationselektroden 2 und 4.

35 Weiterhin ist in Fig. 1 ein Paar Sensorelektroden 8 und 10 dargestellt, die an ein hochohmiges Voltmeter 12 angeschlos-

sen sind. Da sich zwischen den beiden Polarisationselektroden 2 und 4 in einem auf den Träger 14 und die Elektroden aufgebrachten elektrisch leitfähigen Analyten Stromlinien bilden, liegen die Sensorelektroden 8 und 10 mit Bereichen des Analyten unterschiedlichen elektrischen Potentials in Berührung. 5 Diese Potentialdifferenz ist dann am Voltmeter 12 angezeigt. Da das Voltmeter 12 einen hochohmigen Eingangswiderstand besitzt, findet jedoch zwischen Analyt und den Sensorelektroden 8 und 10 kein nennenswerter Ladungstransport, also kein nennenswerter Stromfluss statt. 10

In Figur 1 sind alle vier Elektroden 2, 4, 8 und 10 in Fig. 1 in Interdigitalstruktur angeordnet. Die dargestellte Elektrodenanordnung ist als Teil eines Mikrochips zum Beispiel durch 15 Benutzung der Dünnfilmtechnik auf einem Träger 14, zum Beispiel Silizium mit einer elektrisch isolierenden Deckschicht (nicht dargestellt), z.B. Siliziumoxid, aufgebracht. Alle Elektroden sind durch elektrisch isolierende Zwischenräume 16 voneinander getrennt. Die symbolisch dargestellten Stromquellen 20 und das Voltmeter 12 sind i.A. als integrierte elektrische Schaltungen im Träger 14 z.B. unterhalb der Elektroden ausgeführt. Die Anordnung ist in Ausdehnungsrichtung 17 stark gestaucht dargestellt. Gleiches gilt für die Figuren 2, 3 und 6. 25

Die in Figur 2 dargestellte Ausführungsform der Erfindung beinhaltet ebenfalls ein Paar Polarisationselektroden 2 und 4 und ein Paar Sensorelektroden 8 und 10. Die einzelnen Abschnitte der Elektroden sind jedoch nicht wie in Fig. 1 kamm- 30 bzw. mäanderförmig ineinander gefaltet. Jeder Elektrodentyp ist jeweils als eine Mehrzahl voneinander an sich elektrisch isolierter langer Streifen auf der Chipoberfläche ausgeführt. So sind je zwei Streifen der Polarisationselektroden 2 und 4 und je 4 Streifen der Sensorelektroden 8 und 10 zu sehen. 35

Zur elektrischen Verbindung ist hier jedem Elektrodentyp eine Elektrodensammelleitung zugeordnet. Der Polarisationselektrode 2 ist zum Beispiel die Sammelleitung 18 zugeordnet. Die beiden Streifen der Polarisationselektrode 2 sind deshalb mit 5 Hilfe von elektrischen Durchkontaktierungen 20 mit der ihr zugeordneten Sammelleitung 18 verbunden. Gegenüber allen anderen Elektroden 4, 8 und 10 ist die Sammelleitung 18 elektrisch isoliert. Deshalb liegen Sammelleitungen zum Beispiel 10 vergraben in der Isolierenden Deckschicht 36 des Trägers 14 oder sind zumindest sowohl gegeneinander als auch gegenüber allen Elektroden anderweitig elektrisch isoliert. Der zweiten Polarisationselektrode 4 ist die Sammelleitung 22 mit entsprechenden Durchkontaktierungen 24 zugeordnet usw.

15 In Fig. 3 ist wie aus den Figuren 1 und 2 zu erkennen, dass die geometrischen Abmessungen Breite w und Abstand g der Polarisations- und Sensorelektroden in etwa gleich groß sind. Dies kann eventuell zu Problemen führen, da bei einem vierpoligen Messverfahren üblicherweise die Sensorelektroden stets 20 wesentlich kleiner als die Polarisationselektroden ausgeführt sind. In Figur 3 ist deshalb eine alternative Ausführungsform von Sensorelektroden dargestellt. Die Sensorelektrode 10 enthält eine Sammelleitung 26, die entsprechend den Sammelleitungen 18 und 22 in Figur 2 im Substrat vergraben bzw. genügend 25 elektrisch isoliert von z.B. anderen Leitungen und dem Analyten ausgeführt ist. Der Kontakt zwischen der Sensorelektrode 10 und dem Analyten wird nicht mehr flächig wie in Fig. 1 und 2, sondern nur noch über punktförmige Einzelelektroden 28 hergestellt.

30 Jede Einzelelektrode 28 enthält einen punktförmigen Elektrodenkopf 30, der mit Hilfe einer elektrischen Durchkontaktierung 32 mit der Elektrodensammelleitung 26 verbunden ist. Obwohl die Elektrodenbreite w und der Elektrodenabstand g 35 gleich sind, wird durch diese Maßnahme erreicht, dass die effektive Elektrodenfläche der Sensorelektroden 8 und 10 gegenüber der Fläche der Polarisationselektroden 2 und 4 wesent-

lich kleiner ist. Hier ist nochmals angedeutet, dass in realen Anordnungen die „Länge“ l der Elektrode wesentlich größer als deren Breite w ist.

5 Ein Schnitt durch die Figur 1 entlang der Linie IV-IV ist in den Figuren 4 und 5 dargestellt. In Fig. 4a ist der Aufbau des Trägers 14 aus dem eigentlichen in der Regel einkristallinen Chipträger, also dem Substrat 34, z.B. Silizium, und einer elektrisch isolierenden Schicht 36, z.B. Siliziumoxid, 10 dargestellt. Durch die isolierende Schicht 36 und die Zwischenräume 16 sind die Elektroden 2, 4, 8 und 10 voneinander elektrisch isoliert. Der Analyt 38, der mit der Chipoberfläche und den Elektroden in Kontakt steht, ist von Stromlinien 40 durchsetzt, die in den Polarisationselektroden 2 und 4 enden. 15 Diese Stromlinien 40 entstehen durch die Einspeisung des Polarisationsstromes von der Stromquelle 6 vermittels der Polarisationselektroden 2 und 4 in den Analyten 38.

Bei letzterer Anordnung können Fängermoleküle in einer sehr 20 dünnen Schicht 42 direkt auf der Chipoberfläche angebracht werden. Methoden hierzu sind aus dem Stand der Technik hinreichend bekannt. Ein Zielmolekül aus dem Analyten 38 kann zum Fängermolekül in der Schicht 42 diffundieren. Nur in der Schicht 42 können so Bindungsereignisse überhaupt stattfinden 25 und nur dort detektiert werden. Die Detektion findet statt, weil in der Schicht 42 sich die elektrischen Eigenschaften des Mediums aufgrund der Bindungsereignisse ändern. Die Strom- und Spannungsverhältnisse im Analyten 38 ändern sich und an den Sensorelektroden 8 und 10 wird eine entsprechend 30 geänderte Spannung abgegriffen. Wie aus dem Verlauf der Stromlinien 40 ersichtlich, wird jedoch nur ein sehr geringer Anteil des felddurchsetzten Raumes zur Reaktion benutzt. Die in einer derartigen Anordnung auftretenden Veränderungen der elektrischen Eigenschaften des Analyten und somit die detektierbaren Spannungen zwischen den Sensorelektroden 8 und 10 35 können gegebenenfalls unterhalb des messtechnisch erfassbaren Bereiches von Messspannungen liegen.

Eine Verbesserung kann durch das Aufbringen einer Reaktionsschicht 44 auf den DNA-Chip stattfinden, wie in Fig. 4b gezeigt. In dieser Reaktionsschicht 44, zum Beispiel einem Hydrogel, können in deren gesamten Volumen Fänger moleküle eingebettet bzw. fixiert werden. Die Reaktionsschicht 44 ist nur etwa 5-10 μm dick ausgeführt. Somit kann eine chemische Reaktion zwischen Zielmolekülen aus dem Analyten 38, die in die sehr dünne Reaktionsschicht 44 schnell eindiffundieren können, und den Fänger molekülen stattfinden. Die chemische Reaktion bzw. Veränderung elektrischer Parameter in der Reaktionsschicht 44 wird somit von einem wesentlich größeren Bereich von Stromlinien 40 durchdrungen. Bei einer Reaktion werden deshalb wesentlich größere Spannungen am Voltmeter 12 gemessen.

In den Figuren 5a und 5b liegen die Polarisations elektroden 2 und 4 auf elektrisch isolierenden Stegen 46 beabstandet zur Oberfläche des Trägers 14. Dies kann in bestimmten Fällen, das heißt für bestimmte Kombinationen aus immobilisierter Spezies und Analyt, zu einer günstigeren Feldverteilung im Analytraum 48 führen. Günstiger bedeutet, dass zwischen den Sensorelektroden 8 und 10 eine möglichst große Spannungsdifferenz am Voltmeter 12 gemessen werden kann.

In Figur 5a sind die beiden Sensorelektroden 8 und 10 teilweise im Träger 14 vergraben. In Figur 5b sind diese beiden Elektroden vollständig vergraben und somit galvanisch vom Analytraum 48 getrennt. Der Grad der Eingravur oder die galvanische Trennung können je nach Analyt 38 und immobilisierter Spezies günstiger oder ungünstiger für das Erzielen zuverlässiger Messergebnisse am Voltmeter 12 sein. Auch die Auswahl von Stegen 46 als Träger für die Polarisations elektroden 2 und 4 kann je nach Fall günstiger oder ungünstiger sein. Eine entsprechende Auswahl der strukturellen Anordnung ist in den meisten Fällen experimentell zu finden.

Die Figuren 6a und 6b zeigen nochmals verschiedene Ausführungsformen für die Gestaltung bzw. für die Verbindungstechnik der verschiedenen Elektroden bezüglich des Layouts und der verwendeten Technologien im Halbleiterprozess bei der 5 Chipherstellung. Fig. 6a entspricht bezüglich der Polarisationselektroden 2 und 4 der Ausführungsform in Fig. 1. Allerdings liegen hier die Sensorelektroden 8 und 10 in etwa gleichem Layout wie die Polarisationselektroden 2 und 4, aber unter diesen, getrennt durch eine elektrisch isolierende Zwischenschicht, also Stege 46. Ein Schnitt durch diese Anordnung ist in Fig. 8 dargestellt. Durch einen derartigen Aufbau 10 des DNA-Chips wird ein sehr kompakter Aufbau erreicht, der für beide Elektrodentypen, also Sensor- und Polarisations- 15 elektroden 4 und 2 nahezu die kleinstmögliche, im Halbleiter- prozess erreichbare Strukturgröße und Abstände zueinander erlaubt. Außerdem werden durch den Aufbau von übereinander angeordneten Elektroden das effektive Verhältnis zwischen der Größe beider Elektrodentypen ähnlich wie bei der in Fig. 3 gezeigten Ausgestaltung beeinflusst, die Sensorelektroden 8 20 und 10 zeigen also eine geringe Größe im Verhältnis zu den Polarisationselektroden 2 und 4.

Fig. 6b entspricht der in Fig. 2 dargestellten Anordnung, nur dass auch hier, wie in Fig. 6a, die Elektrodentypen übereinander, anstatt nebeneinander angeordnet sind. Auch bei der in 25 Fig. 6b dargestellten Ausgestaltung liegen die Polarisations- elektroden 2 und 4 wieder auf den elektrisch isolierenden Stegen 46 über den Sensorelektroden 10 und 8, wobei die Stege aus der Draufsicht nicht ersichtlich sind. Ein Schnitt entlang der Linie A-A durch die Anordnung wie in Fig. 6a entspricht auch hier der Figur 8, nur dass die übereinanderliegenden Elektroden vertauscht sind, also die Polarisations- 30 elektroden 2 bzw. 4 über den Sensorelektroden 10 bzw. 8 liegen.

35

Die Auswahl der verwendeten Technologien bzw. Layouts richtet sich meist nach den Gegebenheiten bzw. Randbedingungen des zu

verwendenden Halbleiterprozesses und der mit dem DNA-Chip zu lösenden Aufgabe. Natürlich können auch Kombinationsmöglichkeiten aus den vorgestellten Techniken verwendet werden. So ist es zum Beispiel denkbar, die Polarisationselektroden gemäß Fig. 6a in kammförmiger Interdigitalstruktur auszuführen und die Sensorelektroden gemäß Figur 6b als zu Sammelleitungen durchkontakteierte Einzelstreifen auszuführen und beide Anordnungen durch Stege 46 zu trennen und übereinander anzuordnen.

10

In der Figur 7 sind jeder Sensorelektrode 8 und 10 je zwei Schirmelektroden 50 und 52 zugeordnet. Durch Pufferverstärker 54 ist das jeweilige elektrische Potential der Sensorelektroden 8 und 10 an den Schirmelektroden 50 und 52 elektrisch aktiv gehalten. Die im Fall fehlender Schirmelektroden wirksamen Parasitärkapazitäten 56, 58 und 60 zwischen Sensorelektroden 8 und 10 und Polarisationselektroden 2 und 4 werden durch diese Maßnahme teils elektrisch unwirksam, wie sich leicht aus einem nicht dargestellten elektrischen Ersatzschaltbild der Anordnung ergibt. Mit vorhandenen Schirmelektroden bilden sich nämlich die parasitären Kapazitäten 62 bis 74 aus. Hiervon sind aber nur die Kapazitäten 62, 68 und 74 für die Messung in den Messgeräten Voltmeter 12 und dem der Stromquelle 6 zugeordneten Strommesser wirksam. Die anderen Kapazitäten sind über die Pufferverstärker 54 versorgt, werden also über diese ge- bzw. entladen und gehen somit nicht in die Messung mit ein, was i. A. zu einem wesentlich verbesserten Messergebnis führt. Somit können sich diese parasitären Kapazitäten nicht mehr nachteilig auf die Impedanz zwischen den Sensor- und Polarisationselektroden auswirken.

Die Pufferverstärker 54 können mit Hilfe der Halbleitertechnologie direkt im Träger 14 unterhalb der Elektrodenanordnung realisiert werden. Hierdurch werden Signalwege verkürzt, zusätzliche Kapazitäten so klein wie möglich gehalten, und somit die Frequenzeigenschaften der gesamten Messanordnung günstig beeinflusst. Die verschiedenen in Figur 7 dargestell-

ten Ausführungsformen von Anordnung der einzelnen Elektroden unterscheiden sich dadurch, dass eine oder mehrere Elektroden galvanisch vom Analyten getrennt sind bzw. ganz oder teilweise im Substrat vergraben sind. Die galvanische Trennung erfolgt, wie in Fig. 7a z.B. durch Aufoxidieren einer zusätzlichen Oxidschicht über den Elektroden oder durch Vergraben der Elektroden, wie in Fig. 7e für alle beteiligten Elektroden durchgeführt. Auch in Fig. 7 sind wieder verschiedene Kombinationen zwischen den dargestellten Alternativen denkbar.

5 Diese können durch Simulationen oder im Experiment an die Bedürfnisse einer speziellen Messung bzw. Ausgestaltung des Chips angepasst werden.

10 Auch in Figur 8 sind verschiedenste Kombinationen der Anordnung aus Sensor- und Polarisationselektroden dargestellt. Während die Polarisationselektroden stets auf Stegen über dem Träger ruhen, sind die Sensorelektroden jeweils unterhalb oder innerhalb der Stege angeordnet. Durch diese Maßnahmen kann eine äußerst kompakte Bauweise des DNA- Chips erreicht 15 werden, da die Abstände zwischen den Elektrodentypen minimiert werden können.

20 Figur 9 zeigt Konfigurationen aus Elektroden entsprechend den Figuren 8 wobei hier zusätzlich eine oder mehrere Schirmelektroden zwischen Sensorelektroden untereinander oder zwischen Sensor- und Polarisationselektroden vorgesehen sind. Auch für die in Figur 9 dargestellten Anordnungen gilt bezüglich der Auswahl einer bestimmten Konfiguration das oben Gesagte.

25 30 35 Die in den Figuren dargestellten Ausführungsformen sind Beispiele für die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten aus den aufgeführten Techniken. Natürlich sind, wie mehrfach erwähnt auch andere als die explizit dargestellten Kombinationen möglich.

Patentansprüche

1. DNA-Chip mit einem Träger (14) und einem darauf angeordneten Mikroarray von immobilisierte Fängermoleküle enthaltenden Spots (1), wobei jeder Spot (1) ein Mikroelektrodensystem zur impedanzspektroskopischen Detektion von Bindungseignissen zwischen den Fängermolekülen und Zielmolekülen einer auf die Spots (1) applizierten Analytlösung (38) enthält, dadurch gekennzeichnet, dass das Mikroelektrodensystem ein Dünnschicht-Vierpolsystem ist, wobei das Dünnschicht-Vierpolsystem zwei Polarisationselektroden (2, 4) zur Erzeugung eines elektromagnetischen Wechselfeldes und zwei Sensorelektroden (8, 10) zur Messung eines Spannungsabfalls im Analyten (38) umfasst.
- 15 2. DNA-Chip nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger (14) ein Siliziumsubstrat (34) umfasst, auf dem das Mikroelektrodensystem in Dünnfilmtechnik integriert ist.
- 20 3. DNA-Chip nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens einer Sensorelektrode (8, 10) eine Schirmelektrode (50, 52) zugeordnet ist, die auf dem gleichen elektrischen Potential wie die Sensorelektrode (8, 10) gehalten ist.
- 25 4. DNA-Chip nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass von einem an die Sensorelektrode (8, 10) angeschlossenen Pufferverstärker (54) mit Verstärkung 1 das elektrische Potential der Sensorelektrode (8, 10) an der Schirmelektrode (50, 52) gehalten ist.
- 30 5. DNA-Chip nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Pufferverstärker (54) auf dem Träger (14) integriert ist.
- 35 6. DNA-Chip nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine Sensorelektrode (8, 10) und/oder wenigstens eine Schirmelektrode (50, 52) galvanisch vom Analyten (38) getrennt sind.

7. DNA-Chip nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine Sensorelektrode (8, 10) punktförmige Einzelelektroden (28) enthält, die mittels Durchkontaktierungen 5 (32) mit einer vergrabenen Elektrodensammelleitung (26) elektrisch verbunden sind.

8. DNA-Chip nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Dünnschicht-Mikroelektrodensystem in 10 einer Fängermoleküle enthaltenden Reaktionsschicht (44) eingebettet ist.

9. DNA-Chip nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der Reaktionsschicht (44) unter 100 μm beträgt und mit 15 der Breite der Elektroden bzw. deren Zwischenräume korreliert ist.

10. DNA-Chip nach Anspruch 9, wobei die Breite der Elektroden etwa 1 μm beträgt, dadurch gekennzeichnet, dass die Dicke der 20 Reaktionsschicht (44) etwa dem 5-10fachen Wert der Elektrodenbreite entspricht.

11. DNA-Chip nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktionsschicht (44) ein Hydrogel ist.

25

12. DNA-Chip nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Dünnschicht-Vierpolsystem eine Interdigital-Stromelektrodenanordnung mit Doppelmaanderstromabgriffen bildet.